

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ZYTOTOXISCHE WIRKUNG VON LYMPHOZYTEN AUF LEBERTARGETZELLEN

von
Rudolf Schmeißner
aus
Zusmarshausen

1973
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548407_0074

Aus der Abteilung für klinische Immunologie
des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. med. F. Scheiffarth

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ZYTOTOXISCHE WIRKUNG VON LYMPHOZYTEN AUF LEBERTARGETZELLEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Rudolf Schmeißner
aus
Zusmarshausen

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen - Nürnberg



Dekan : Prof. Dr. L. Demling

Referent : Prof. Dr. F. Scheiffarth

Tag der mündlichen Prüfung : 3. Dezember 1973

MEINEN LIEBEN ELTERN
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

Eine experimentelle Immunhepatitis kann bei bestimmten Mäuseinzuchtstämmen durch Injektion von allogenem Lebergesamthomogenat, zusammen mit Freund'schem Adjuvans induziert werden (8, 11, 14). Diese Hepatitis ist nicht mit Serum, wohl aber mit Lymphocyten übertragbar. Eine Induktion der Hepatitis gelingt bei thymektomierten Tieren nicht (12). Inkubation von Lymphknoten und Milzzellen mit Lebergewebsantigen führt zu einer Stimulation der DNS-Synthese, die am vermehrten Einbau von ^3H -Thymidin gemessen werden kann (13). Aus diesen Experimenten wurde gefolgert, daß die Induktion der experimentellen Immunhepatitis eine T-Zellabhängige Immunreaktion darstellt.

In den vorliegenden Untersuchungen sollte nachgeprüft werden, inwieweit Lymphocyten von Tieren mit Immunhepatitis auf isogene oder allogene Lebertargetzellen zytotoxisch wirken, inwieweit dieser Effekt Leberzellspezifisch ist und inwieweit es gelingt, einen analogen zytotoxischen Effekt durch Inkubierung von Lymphocyten mit Lebergewebsantigen mit oder ohne Phytohämagglutinin zu induzieren.

METHODIK

MÄUSE

Zur Gewinnung von Lebertargetzellen wurden 21 bis 28 Tage alte Embryos des AKR-Inzuchtstammes AKR verwendet.

Die Lymphocyten präpariert aus 4 - 6 Monate alten AKR- und C₅₇Bl-Mäusen. Die Mäuse stammten aus der eigenen Inzucht Zuchtkolonie.

ZELLKULTUR

21 - 28 Tage alte Embryos von AKR-Müttern wurden durch Sectio steril entnommen. Zum Entbluten wurden die Embryos dekapitiert, die Lebern entnommen und in einer Petrischale mit feiner Schere zerkleinert. Die Leberbröckchen wurden zweimal in 10 ml 0,25% Trypsin gewaschen, anschließend zum Trypsinisieren in 10 ml 0,25%iges Trypsin bei 37°C gegeben und 5 Minuten lang langsam geschüttelt. Nach dem Sedimentieren der groben Partikel wurde der Überstand in RPMI-Medium 1640 (Zusatz von 15% inaktiviertes fetales Kälberserum) von Zimmertemperatur gegeben im Verhältnis 1 Teil Überstand : 3 Teile Medium. Die sedimentierten Leberbröckchen wurden erneut trypsinisiert und in RPMI-Medium gegeben. Die so gewonnene Zellsuspension wurde bei Zimmertemperatur 7 min lang bei 1000 Umdrehungen (entspricht 300 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, die sedimentierten Zellen wurden in etwa 20 ml RPMI-Medium 1640 + 15 % Kälberserum resuspendiert und in eine 200 ml Zellzuchtflasche der Firma Schott & Gen gefüllt. Es wurden etwa 5×10^5 Zellen pro ml Medium angesetzt. Die Flaschen wurden im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt, nach 2 - 3 Tagen wurde das Medium gewechselt. Am 4. bis 6. Tag waren die Kulturen dicht gewachsen und konnten zur Verpflanzung auf Mikrottestplatten verwendet wer-

den. Dabei wurde folgendermaßen verfahren: Das RPMI-Medium wurde aus den Vierkantflaschen abgegossen und die Flaschen zweimal mit etwa 5 ml 0,25 %igem Trypsin ausgespült. Nun wurden 2 ml 0,25% Trypsin von 37°C über die Zellschicht gegeben. Bis zur Lösung der Zellen verblieb die Flasche auf einem Schüttler im Brutschrank. Die losgelösten Zellen wurden mit RPMI-Hepes-Medium so verdünnt, daß 200 Zellen pro Vertiefung auf die Mikrottestplatten (Falcon-Plastic) getropft werden konnten. Nach vier bis sechs Stunden waren die Zellen adhärent, so daß das Zelldebris abgesaugt werden konnte und die Lymphocyten auf die so präparierten Mikrottestplatten gegeben wurden.

Als Kontrollzellkulturen wurden etablierte Mäusezellen der Firma Grand Biol & Co. NCTC-Zellen verwendet.

GEWINNUNG IMMUNISIERTER LYMPHOCYTEN VON AKR-MÄUSEN MIT ALLOGENER LEBER

Die kleingeschnittene Leber einer C₅₇Bl Maus wurde mit Hank'scher Lösung 1 : 9 verdünnt, daraus ein Homogenat hergestellt, und dieses 1 : 1 mit Freundschem Adjuvans versetzt. 0,1 ml dieser Flüssigkeit (entsprechend ca. 5 mg Protein) wurden in die Pfötchen von AKR-Mäusen injiziert. Weiterhin wurde mindestens viermal im Abstand von 10 Tagen Leberhomogenat (ca. 5 mg Protein), ohne Zusatz von Freundschem Adjuvans intraperitoneal injiziert.

GEWINNUNG VON FRISCH PRÄPARIERTEN LYMPHOCYTEN AUS SENSIBILISIERTEN UND NICHT SENSIBILISIERTEN AKR- UND C₅₇BL-MÄUSEN

Lymphknoten und Milzen wurden aus sensibilisierten und nicht sensibilisierten AKR- und C₅₇Bl-Mäusen gewonnen und mit einer Pinzette zerzupft. Das gewonnene Material wurde in ein Röhrchen mit Eagles

minimal essential Medium (MEM) gegeben. Die groben Partikel sedimentierten nach kurzem Stehen. Die Mittelfraktion mit den Lymphocyten wurde 7 min lang bei 4°C mit 1000 rpm zentrifugiert. Die sedimentierten Lymphocyten wurden in RPMI-Medium bzw NCTC-Medium resuspendiert, gezählt, und in einer Konzentration von 10^4 und 10^5 auf die Mikrottestplatten gebracht.

24-STÜNDIGE INCUBIERUNG VON SENSIBILISIERTEN LYMPHOCYTEN MIT ZUSATZ VON PHA ODER LEBEREXTRAKT

Auf oben beschriebene Weise gewonnene Lymphocyten wurden in einer Menge von 3 Mio pro 3 ml in verschließbaren Glasröhrchen, teilweise mit Zusätzen versehen, 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C belassen.

Für die genaue Beschreibung werden folgende Zeichen verwendet:

- N - Lymphocyten von AKR-Mäusen, die mit Leber von C_{57}Bl -Mäusen sensibilisiert waren, ohne Zusatz.
- P - Lymphocyten von AKR-Mäusen, die mit Leber von C_{57}Bl -Mäusen sensibilisiert waren, mit Zusatz von 0,005 ml PHA (Phytohämagglutinin Wellcome) pro Röhrchen.
- L - Lymphocyten von AKR-Mäusen, die mit Leber von C_{57}Bl -Mäusen sensibilisiert waren, mit Zusatz von 0,1 ml (pro Röhrchen) mit Hank'scher Lösung 1 : 10 verdünntem, homogenisiertem Leberextrakt von einer C_{57}Bl -Maus.

Analog wurde mit Lymphocyten von C_{57}Bl -Mäusen, die mit Leber von AKR-Mäusen sensibilisiert waren, verfahren.

Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Röhrchen bei 4°C 7 min lang bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Lymphocyten wurden gepoolt, gezählt, und in einer Konzentration von 10^4 und 10^5 pro Vertiefung der Mikrottestplatte auf die Targetzellen gegeben.

MIKROCYTOTOXISCHER TEST NACH TAKASUGI UND KLEIN (17)

Als Targetzellen benützten wir embryonale Leberzellen von AKR-Mäusen bzw NCTC-Zellen. In jede Vertiefung der Mikrottestplatte gaben wir 200 Zellen. Die so beschickten Mikrottestplatten wurden für 6 Stunden in einen begasten feuchten Brutschrank bei 37°C, 7 % O_2 , 10% CO_2 , 83 % N_2 gegeben. Nach Adhärenz der Targetzellen auf den Boden der Mikrottestplatten wurden die Zellbedris abgesaugt. Die Lymphocyten, suspendiert in RPMI-Medium bzw NCTC-Medium, wurden in einer Menge von 10^4 und 10^5 pro Vertiefung in die sechs Vertiefungen jeder Reihe der Mikrottestplatten getropft. Die Mikrottestplatten verblieben für 48 Stunden im feuchten, begasten Brutschrank bei 37°C. Nach 24 Stunden wurde das Medium erneuert. Die, nach 48 Stunden aus dem Brutschrank genommenen Mikrottestplatten wurden vorsichtig mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, um die Lymphocyten und Zelldebris zu entfernen. Danach wurden die Zellen nach May-Grünwald gefärbt. Die intakten Zellen wurden unter dem Mikroskop ausgezählt.

Der Prozentsatz der Targetzellenreduktion wurde nach folgenden Formeln berechnet:

$$\frac{n - s}{n} \times 100 \quad \frac{N - P}{N} \times 100 \quad \frac{N - L}{N} \times 100 = \% \text{ Reduktion}$$

- n : Zahl der Targetzellen die mit frischpräparierten, nicht sensibilisierten Lymphocyten beschickt worden waren.
- s : Zahl der Targetzellen, die mit frischpräparierten, sensibilisierten Lymphocyten beschickt waren.
- N : Zahl der Targetzellen, die mit 24 Stunden lang bebrüteten, sensibilisierten Lymphocyten beschickt worden waren.
- P : Zahl der Targetzellen, die mit 24 Stunden lang bebrüteten sensibilisierten Lymphocyten unter Zusatz von Phytohämagglutinin beschickt worden waren.
- L : Zahl der Targetzellen, die mit 24 Stunden bebrüteten sensibilisierten Lymphocyten unter Zusatz von homogenisiertem Leberextrakt beschickt worden waren.

ERGEBNISSE

Die Ergebnisse des Mikrocytotoxizitätstestes sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Lymphocyten von AKR-Mäusen, die gegen allogene Leber sensibilisiert wurden, zeigen danach eine hohe cytotoxische Aktivität gegenüber isogenen Lebertargetzellen, während sie in Kontrollkulturen, bei denen NCTC-Zellen als Targetzellen verwendet wurden, keine Zytotoxizität aufweisen. Eine deutlich geringere Zytotoxizität konnte nachgewiesen werden, wenn die Lymphocyten gegen isogene Leber sensibilisiert worden waren; dies traf sowohl für Versuche zu, bei denen Lymphocyten und Targetzellen allogener Herkunft waren, als auch für Versuche unter Verwendung von NCTC-Zellen als Targetzellen.

Vorinkubierung der Lymphocyten mit Lebergewebsantigen in vitro führte zu keiner Steigerung der zytotoxischen Aktivität im isogenen System (Lymphocyten und Targetzellen von AKR-Stamm), während im allogenen System (Lymphocyten von C₅₇Bl-Mäusen und Targetzellen vom AKR-Stamm) die Inkubierung der Lymphocyten mit Lebergewebsantigen die zytotoxische Aktivität erhöhte. Ein vergleichbares Ergebnis konnte bei Verwendung von NCTC-Zellen nicht beobachtet werden. Hier konnte in keinem Falle eine zytotoxische Aktivität der Lymphocyten nachgewiesen werden. Vorinkubierung der Lymphocyten mit Phytohämagglutinin führte demgegenüber zu einem Verlust der zytotoxischen Aktivität gegenüber isogenen wie allogenen Lebertargetzellen.

Ly	Sens. Modus	n	% Reduktion von AKR- Lebertargetzellen		n	% Reduktion von NCTC- Lebertargetzellen	
			10 ⁴ Ly	10 ⁵ Ly		10 ⁴ Ly	10 ⁵ Ly
AKR	allogene Leber in vivo	30	26,8±12,6	34,5± 8,3	18	- 9,3± 8,2	- 4,0±10,8
C ₅₇ Bl	autologe Leber in vivo	24	3,3±10,1	- 1,5± 0,4	18	- 6,2± 3,2	+ 5,8± 2,9
AKR	autologe Leber in vivo	24	14,4± 4,8	28,6± 1,5	18	2,4± 4,8	6,3± 2,3
AKR	allogene Leber in vitro	24	22,3±16,3	45,6±16,8	18	-14,1±18,3	- 3,4±10,9
AKR	PHA in vitro	24	5,5± 8,9	23,0±15,7	18	-23,8±16,4	25,2± 8,3
C ₅₇ Bl	autologer Leber in vitro	24	19,5± 7,3	22,3±11,5	18	-24,2±23,8	27,8±14,6
C ₅₇ Bl	PHA in vitro	24	3,5±12,4	27,0± 6,0	18	-16,8±16,0	- 2,4± 5,6

Abb. 1 Ergebnisse des Mikrocytotoxizitätstestes

DISKUSSION

Aufgrund der dargestellten Ergebnisse führt eine Immunisierung von Mäusen mit isogenem wie allogenen Leberzellhomogenat zu einer leberzellspezifischen zytotoxischen Aktivität der Lymphknoten- und Milzzellen. Diese Zytotoxizität ist nicht von der isogenen oder allogenen Herkunft der Lebertargetzellen abhängig, sondern von der Organherkunft der Zellen. In Kontrollkulturen, bei denen NCTC-Zellen (etablierte Mäusezellkulturen) verwendet wurden, ließ sich eine sichere Zytotoxizität nicht nachweisen.

Die Versuche zeigen, daß der im Übertragungsversuch nachgewiesenen Funktion der Lymphocyten bei der Entstehung der Immunhepatitis eine leberzellspezifisch cytotoxische Reaktion in vitro entspricht. Die Ergebnisse machen es wahrscheinlich, daß es sich um einen T-zell abhängigen zytotoxischen Effekt handelt. Danach ist anzunehmen, daß die Effektorzellen eine direkte Reaktion mit spezifischen Oberflächendeterminanten der Leberzellen eingehen, die zur Schädigung der Targetzellen führen (1, 4, 6). Bemerkenswerterweise führte die Sensibilisierung mit allogenen Leberzellen zu einer höheren zytotoxischen Aktivität, als die Sensibilisierung mit isogenem Leberzellhomogenat. Eine Sensibilisierung gegen H isokompatibilitäts-antigene scheidet aber als Ursache der Zytotoxizität auf Grund der Kontrollversuche mit verschiedenen allogenen und isogenen Targetzellen aus.

Bemerkenswerterweise konnte weder durch eine spezifische (Inkubierung mit Leberzellhomogenat), noch durch eine unspezifische (Inkubierung mit Phytohämagglutinin) Stimulierung von Lymphocyten eine Steigerung der zytoxischen Aktivität erzielt werden. Die Zellen hatten im Gegenteil ihre zytotoxische Aktivität weitgehend verloren.

Dieser Befund steht in gewissem Widerspruch zur Literatur (3, 4, 5), in der über zytotoxische Aktivität stimulierter Lymphocyten gegenüber Targetzellen verschiedenartiger Herkunft berichtet wird. Als Ursache wurde hierfür ein Lymphotoxin identifiziert, das binnen der ersten 24 Stunden von aktivierten T-Zellen produziert wird, und im Überstand nachweisbar ist (2, 7). Die Frage, inwieweit zytotoxische Aktivität von den stimulierten Zellen produziert und in den Überstand abgegeben wurde, bedarf weiterer Untersuchungen.

ZUSAMMENFASSUNG

Lymphocyten von Tieren, die gegen Leberzellantigene sensibilisiert worden waren, wurden auf ihre zytotoxische Aktivität gegenüber Lebertargetzellen untersucht. Lymphocyten von Tieren, die im Gefolge einer Immunisierung mit Lebergesamthomogenat eine experimentelle Immunhepatitis entwickeln, zeigen eine erhöhte Zytotoxizität gegenüber allogenen wie isogenen Lebertargetzellen; diese zytotoxische Reaktion ist leberzellspezifisch. Durch spezifische oder unspezifische Aktivierung von Lymphocyten im Sinne der Bastzellentransformation läßt sich eine Steigerung der zytotoxischen Aktivität der Lymphocyten nicht nachweisen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. GINSBURG, H.
Graft versus host reaction in tissue culture. I. Lysis of monolayers of embryo mouse cells from strains differing in H2-histocompatibility locus by rat lymphocytes sensitized in vitro.
Immunology 14 , 621 (1968)
2. GRANGER, G.A. and KOLB, W.P.
Lymphocyte in vitro cytotoxicity: Mechanisms of immune and non - immune small lymphocyte mediated target L cell destruction.
Immunology 101 , 111 (1968)
3. NASPITZ, Ch. K. and RICHTER, M.
The action of phytohemagglutinin in vivo and in vitro.
A review.
Prog. Allergy 12 , 1 (1968)
4. PERLMANN, P. and HOLM, G.
Cytotoxic effects lymphoid cells in vitro.
Adv. Immunol 11 , 117 (1969)
5. PERLMANN, P., NILSSON, H. and LEON, M.A.
Inhibition of Cytotoxicity of lymphocytes by Concanavalin A in vitro.
Science 168 , 1112 (1970)

6. ROSENAU, W. and MOON, H.D.
The inhibitory effect of hydrocortison lysis of homologous cells by lymphocytes in vitro.
J. Immunol. 89 , 422 (1962)
7. RUDDLE, N.H. and WAKSMAN, B.H.
Cytotoxicity of lymphocytes.
J. exp. Med. 128 , 1237 (1968)
8. SCHEIFFARTH, F. and WARNATZ, H.
Studies concerning the importance of mononuclear cells in the development of experimental hepatitis.
J. Immunol. 98 , 396 (1967)
9. SCHEIFFARTH, F., WARNATZ, H. and LIEBELT, H.
Studien zur Übertragbarkeit der experimentellen Hepatitis im Parabioseversuch.
Z. Immunitätsforsch. 136 , 60 (1968)
10. TAKASUGI, M. and KLEIN, E.
A Microassay for cell - mediated immunity.
Transplantation 9 , 219 (1970)
11. WARNATZ, H., SCHEIFFARTH, F., WOLF, F. and SCHMIDT, H.J.
Autoradiographic experiments concerning the importance of mononuclear cells in experimental hepatitis.
J. Immunol. 98 , 402 (1967)

12. WARNATZ, H., SCHEIFFARTH, F. and SCHMIDT, G.
Immunological studies on the development of experimental
hepatitis in the thymectomized mice.
Int. Arch. Allergy 32 , 308 (1967)

13. WARNATZ, H.
Das Phänomen der Lymphozytentransformation in der Pathogenese
und Diagnostik von Autoimmunerkrankungen.
Z. Ges. Exp. Med. 149 , 64 (1969)

14. WARNATZ, H.
Cellular immune reactions in chronic hepatitis and in experi-
mental hepatitis of the mouse.
In: Bayer-Symposion. Große Ledder I, 234
Springer-Verlag, Heidelberg 1969

Herrn Professor Dr. F. Scheiffarth möchte ich für die freundliche
überlassung des Themas danken.

Ein besonderes Anliegen ist es mir, Herrn Professor Dr. H. Warnatz,
der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, meinen Dank auszu-
sprechen.

Für ihre stete und freundliche Mitarbeit bedanke ich mich herzlich
bei Frau H. Leowald und Herrn E. Rückert.

LEBENS LAUF

Am 18. März 1945 wurde ich, Rudolf S c h m e i ß n e r , als Sohn des Apothekers Dr. Karl Schmeißner und seiner Frau Maria, geb. Gaa in Zumarshausen, Landkreis Augsburg geboren.

In Mering bei Augsburg besuchte ich von 1951 bis 1955 die Volksschule. Am 1. September 1955 wechselte ich an das Humanistische Gymnasium bei St. Stephan in Augsburg. Dort erhielt ich am 22. Juli 1964 das Reifezeugnis.

Von Oktober 1964 bis September 1966 war ich Apothekerpraktikant in der Mohrenapotheke in Augsburg. Am 5. September 1966 legte ich die pharmazeutische Vorprüfung ab.

Von November 1966 bis Januar 1973 studierte ich an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen Humanmedizin, mit Ausnahme des Wintersemesters 1969/70, in dem ich an der Universität Wien inskribiert war. Am 19. Januar 1973 schloß ich das Studium der Humanmedizin mit dem Staatsexamen ab.

Seit 1. August 1973 bin ich an der Universitätsfrauenklinik in Ulm als Medizinalassistent tätig.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990